

(C) WPI / Thomson

AN - 2003-881864 [82]

AP - JP20010341791 20011107

CN - R04686-K R04686-T R04686-U R19452-K R19452-T R19452-U RA00TM-K  
 RA00TM-T RA00TM-U RA00TN-K RA00TN-T RA00TN-U RAAA9A-K RAAA9A-T  
 RAAA9A-U RA37W9-K RA37W9-T RA37W9-U R13045-K R13045-T R13045-U  
 R07947-K R07947-T R07947-U R07947-K R07947-T R07947-U R00971-K  
 R00971-T R00971-U RA0055-K RA0055-T RA0055-U R01318-K R01318-T  
 R01318-U R14561-K R14561-T R14561-U RA0KVC-K RA0KVC-T RA0KVC-U

CPY - KYOU

DC - A21 A96 B04

DCR - [1] 90953 CL USE; 94290 CL USE; 95853 CL USE; 94306 CL USE; 705331 CL  
 USE; 357837 CL USE; 94291 CL USE; 95854 CL USE; 94307 CL USE; 105172  
 CL USE; 96855 CL USE; 108704 CL USE; 104714 CL USE

DR - 0971-U 1318-U

DW - 200382

IC - C09K15/08; A61K31/775; A61P35/00; A61P39/06; A61P43/00; C08G65/44;  
 C08G8/20; C09K15/34

IN - KOBAYASHI S; KURISAWA G; TEI S; UYAMA H

LNKA- 2003-250191

M2 - [01] D013 D023 D120 G015 G100 H4 H405 H421 H444 H8 M1 M113 M280 M320  
 M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
 R04686-K R04686-T R04686-U

- [02] D013 D023 D120 G015 G100 H4 H405 H421 H444 H8 M1 M113 M280 M320  
 M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
 R19452-K R19452-T R19452-U

- [03] D013 D023 D120 G017 G100 H4 H405 H421 H444 H8 M1 M113 M280 M320  
 M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
 RA00TM-K RA00TM-T RA00TM-U

- [04] D013 D023 D120 G017 G100 H4 H405 H421 H444 H8 M1 M113 M280 M320  
 M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
 RA00TN-K RA00TN-T RA00TN-U

- [05] D013 D120 G015 G017 G100 H4 H402 H442 H5 H543 H8 J0 J011 J2 J221  
 M1 M113 M123 M136 M210 M211 M272 M283 M320 M412 M511 M520 M532 M540  
 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624; RAAA9A-K RAAA9A-T  
 RAAA9A-U

- [06] D013 D023 D120 G015 G017 G100 H4 H405 H444 H8 J0 J011 J2 J221 M1  
 M113 M123 M136 M280 M320 M412 M511 M520 M532 M540 M781 M904 M905 P610  
 P616 P633 P714 Q120 Q624; RA37W9-K RA37W9-T RA37W9-U

- [07] D013 D023 D120 G015 G017 G100 H4 H405 H444 H8 J0 J011 J2 J221 M1  
 M113 M123 M136 M280 M320 M412 M511 M520 M532 M540 M781 M904 M905 P610  
 P616 P633 P714 Q120 Q624; R13045-K R13045-T R13045-U

- [08] D013 D023 D120 G017 G019 G100 H4 H405 H444 H8 J0 J011 J2 J221 M1  
 M113 M123 M136 M280 M320 M412 M511 M520 M532 M540 M781 M904 M905 P610  
 P616 P633 P714 Q120 Q624; R07947-K R07947-T R07947-U

- [09] D012 D013 D016 D023 D120 G017 G019 G100 H4 H405 H444 H8 J0 J011  
 J2 J221 M1 M113 M123 M136 M280 M320 M412 M511 M520 M532 M540 M781 M904  
 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624; R07947-K R07947-T R07947-U

- [10] D014 D023 D120 G015 G100 H4 H404 H405 H421 H444 H8 J5 J521 J522  
 L9 L960 M1 M113 M280 M320 M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 M910  
 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624; R00971-K R00971-T R00971-U RA0055-K  
 RA0055-T RA0055-U

- [11] D013 D023 D120 F012 F013 F014 F015 F016 F019 F123 F199 G015 G100  
H4 H405 H424 H442 H5 H522 H541 H8 J5 J521 K0 L8 L814 L817 L822 L831 M1  
M113 M125 M141 M210 M211 M240 M272 M281 M311 M321 M342 M373 M391 M412  
M511 M522 M531 M540 M781 M904 M905 M910 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
R01318-K R01318-T R01318-U

- [12] D013 D019 D023 D029 D120 D199 G023 G036 G230 H4 H405 H422 H444  
H461 H8 J5 J561 M1 M115 M116 M280 M320 M412 M512 M520 M531 M540 M781  
M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624; R14561-K R14561-T R14561-U

- [13] D013 D023 D120 G015 G100 H4 H405 H421 H444 H8 M1 M113 M280 M320  
M412 M511 M520 M531 M540 M781 M904 M905 P610 P616 P633 P714 Q120 Q624;  
RAOKVC-K RAOKVC-T RAOKVC-U

MC - A12-W11L B04-A03 B06-A01 B14-D05D B14-H01 B14-L01 B14-L06 B14-S08

PA - (KYOU ) UNIV KYOTO

PN - JP2003138258 A 20030514 DW200382

PR - JP20010341791 20011107

XIC - C09K-015/08; A61K-031/775; A61P-035/00; A61P-039/06; A61P-043/00;  
C08G-065/44; C08G-008/20; C09K-015/34

AB - NOVELTY :  
An antioxidant comprises polyphenol polymer.

- ACTIVITY :  
Cytostatic.  
No test detail is given.

- MECHANISM OF ACTION :  
Superoxide Dismutase Inhibitor; DNA Polymerase Stimulator.  
No test details are given.

- USE :  
For providing antioxidant and cytostatic effect and for suppressing  
production of peroxy lipids and also for suppressing DNA polymerase  
deactivation.

- ADVANTAGE :  
The antioxidant has excellent cytostatic activity and effectively  
suppresses the formation of peroxy lipids and prevents DNA polymerase  
deactivation.

- POLYMERS :  
Preferred Composition: The polyphenol is a phenol having  $\geq 3$  phenolic  
hydroxyl groups, and has a flavonoid structure. The polyphenol polymer  
is synthesized by polycondensation of polyphenol and aldehyde, or by  
the oxidative coupling of polyphenol.  
Preferred Components: The polyphenol is catechin, epicatechin,  
gallic acid, epigallocatechin, catechin gallate, epicatechin  
gallate, gallic acid gallate, epigallocatechin gallate, quercetin,  
hesperidin, theaflavin, procyanidin or leuco anthocyanidin.

- EXAMPLE :  
Catechin (1.5 g) was added to methanol (15 ml) and phosphoric acid  
buffer (15 ml) to obtain a solution. Horse-radish peroxidase (5 mg)  
was added to the solution and 5% hydrogen peroxide solution (3.4 ml)  
was added at a speed of 1.7 ml/hour, stirred and after reacting for 24  
hours, insoluble polymers were removed by centrifugation, and solvent  
of supernatant liquid was distilled and polymer (1.35 g) was isolated.

INW - KOBAYASHI S; KURISAWA G; TEI S; UYAMA H

IW - ANTIOXIDANT CYTOSTATIC ACTIVE USEFUL SUPPRESS FORMATION DNA POLYMERASE  
DEACTIVATE COMPRISE POLYPHENOL POLYMER

IWW - ANTIOXIDANT CYTOSTATIC ACTIVE USEFUL SUPPRESS FORMATION DNA POLYMERASE  
DEACTIVATE COMPRISE POLYPHENOL POLYMER

NC - 1

NPN - 1

OPD - 2001-11-07

PAW - (KYOU ) UNIV KYOTO

PD - 2003-05-14

TI - Antioxidant having cytostatic activity and useful for suppressing  
formation of peroxy lipids and DNA polymerase deactivation, comprising  
polyphenol polymer

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-138258

(P2003-138258A)

(43) 公開日 平成15年5月14日 (2003.5.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード <sup>*</sup> (参考)
C 0 9 K 15/08		C 0 9 K 15/08	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/775		A 6 1 K 31/775	4 H 0 2 6
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 J 0 0 5
39/06		39/06	4 J 0 3 3
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-341791 (P2001-341791)

(22) 出願日 平成13年11月7日 (2001.11.7)

(71) 出願人 391017442

京都大学長

京都府京都市左京区吉田本町36の1番地

(72) 発明者 宇山 浩

滋賀県大津市本堅田4-16-6-404

(72) 発明者 鄭 主恩

京都府京都市中京区式阿弥町130-1005

(72) 発明者 栗沢 元一

京都府京都市中京区式阿弥町130-1005

(74) 代理人 100072051

弁理士 杉村 興作 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化剤

(57) 【要約】

【課題】 ポリフェノール重合体からなる抗酸化剤を提供すること。

【解決手段】 本発明の抗酸化剤は、ポリフェノール重合体からなることを特徴とする。本発明の抗酸化剤は、ポリフェノールがフェノール性水酸基を三つ以上有するフェノール類であることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリフェノール重合物を含有することを特徴とする抗酸化剤。

【請求項2】 ポリフェノールがフェノール性水酸基を三つ以上有するフェノール類であることを特徴とする請求項1記載の抗酸化剤。

【請求項3】 ポリフェノールがフラボノイド骨格を有していることを特徴とする請求項1又は2項に記載の抗酸化剤。

【請求項4】 ポリフェノール重合物がポリフェノールとアルデヒドの重縮合により合成されることを特徴とする請求項1〜3項のいずれか1項に記載の抗酸化剤。

【請求項5】 ポリフェノール重合物がポリフェノールの酸化カップリングにより合成されることを特徴とする請求項1〜3項のいずれか1項に記載の抗酸化剤。

【請求項6】 ポリフェノールが、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、クエルセチン、ヘスペリジン、テアフラビン、プロシアニジン、ロイコアントシアニンからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1〜5項のいずれか1項に記載の抗酸化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗酸化剤に関し、特にカテキン、ルチン等のフェノール性水酸基を多く有するポリフェノール重合物を含有することを特徴とする抗酸化剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、植物に含まれるカテキン、エピガロカテキンガレート、クエルセチン、ヘスペリジン、ルチン等のポリフェノール類に抗酸化性や殺菌作用があることが知られている。さらに抗ガン作用、抗炎症作用、紫外線吸収作用、毛細血管の強化、血圧上昇抑制、血圧降下作用、記憶力向上、肝機能向上、脂肪吸収抑制、ストレス抑制、女性ホルモンバランス調整、抗腫瘍作用、突然変異抑制、血中コレステロール抑制、整腸作用等の効果も知られており、生医学分野への応用が期待されている。これらポリフェノールを高分子化することにより、細胞での滞在時間が低分子ポリフェノールよりも延長し、これら生化学活性が増大することが期待される。

【0003】天然に存在するポリフェノール類には水溶性で分子量1万以上のものも知られているが、その構造は明らかではない。一方、生化学活性が詳細に調べられているカテキン等の低分子量ポリフェノールを重合して高分子化する技術はいくつか知られている。J. Agric. Food Chem. 45, 1045 (1997) によると酢酸触媒によりカテキンとアセトアルデヒドの

重縮合が進行し、分子量六千のポリマーが得られている。また、FEMS Microbiology Letters, 143, 35 (1996) によるとペルオキシダーゼを触媒に用いたカテキンの酸化カップリングにより、重合度5以下のオリゴマーが得られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これらポリフェノールの重合物の構造解析が困難であり、明らかにされていない。さらに、ポリフェノール重合物を抗酸化剤として使用できるかいなかについても十分に解析されていない。

【0005】本発明は、抗ガン活性の付与、過酸化脂質生成の抑制、DNAポリメラーゼ失活の抑制等の抗酸化作用を有するポリフェノールの重合物を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ポリフェノール重合物が抗酸化作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】本発明の抗酸化剤は、ポリフェノール重合物からなることを特徴とする。

【0008】本発明の抗酸化剤の好ましい実施態様において、ポリフェノールがフェノール性水酸基を三つ以上有するフェノール類であることを特徴とする。

【0009】本発明の抗酸化剤の好ましい実施態様において、ポリフェノールがフラボノイド骨格を有していることを特徴とする。

【0010】本発明の抗酸化剤の好ましい実施態様において、ポリフェノール重合物がポリフェノールとアルデヒドの重縮合により合成されることを特徴とする。

【0011】本発明の抗酸化剤の好ましい実施態様において、ポリフェノール重合物がポリフェノールの酸化カップリングにより合成されることを特徴とする。

【0012】本発明の抗酸化剤の好ましい実施態様において、ポリフェノールが、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、クエルセチン、ヘスペリジン、テアフラビン、プロシアニジン、ロイコアントシアニンからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に用いるポリフェノールは、特に制限されるものではない。生医学分野での応用に必要への水溶性付与という観点から、フェノール性水酸基を三つ以上含む化合物が好ましい。このようなポリフェノールの具体例としては、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エ

ビガロカテキンガラート、ルチン、クエルセチン、ヘスベリジン、テアフラビン、プロシアニジン、ロイコアントシアニジン等からなる群から選択される少なくとも1種を挙げることができる。これらは単独あるいは混合物として使用される。

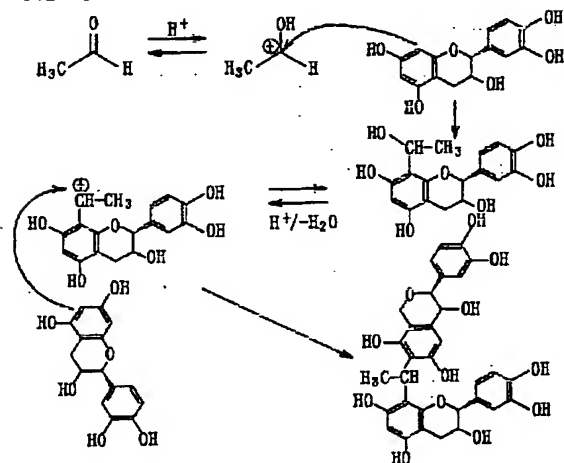
【0014】また、生成ハイブリッドへの高い抗酸化性付与という観点から、フラボノイド骨格を有する化合物が好ましい。

【0015】ポリフェノールの重合物はアルデヒドとの重縮合または酸化カップリングにより製造することができる。

【0016】まず、アルデヒドとの重縮合によるポリフェノール重合物について説明する。本発明で使用されるアルデヒドは、ポリフェノールと反応するものであれば、特に制限されるものではない。具体例としては、ホルマリン、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、カブロンアルデヒド、ベンズアルデヒド、2-メトキシベンズアルデヒド、3-シアノベンズアルデヒド、p-ジフェニルアルデヒド、クロトンアルデヒド等が挙げられる。これらは単独あるいは混合物として使用され、ポリフェノール1gに対して、アルデヒドを0.1~1000グラムの範囲で用いることが好ましい。アルデヒドの量を長くすると、より高分子化されるので、分解されにくく体内での残存時間を延長させることができる利点を有する。

【0017】ポリフェノールとアルデヒドの重縮合の反応を、一例で示すと以下のようである。

【化1】



【0018】ポリフェノールとアルデヒドの重縮合では、反応を効率よく進めるために酸触媒を加えても良い。用いる酸触媒は特に制限はなく、公知のものが使用できる。具体例として酢酸、トリフルオロ酢酸、塩酸、硫酸、硝酸、トリフルオロボレート、パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸等が挙げられる。ポリフェノール1gに対して、これらの酸触媒を0.01mg~1

00gの範囲で用いることが好ましい。

【0019】ポリフェノールとアルデヒドの重縮合に用いる溶媒としては、ポリフェノールとアルデヒドと触媒が共に溶解するものが好ましい。具体例としてメタノール、エタノール、N、N-ジメチルホルムアミド、N、N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン、ニトロメタン、ニトロベンゼン、ピリジン、1,4-ジオキサン、アセトン、メチルエチルケトン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、トルエン、ベンゼン、蒸留水、脱イオン水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液を用いる場合はpH2~12の範囲が望ましい。緩衝液の種類としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液等が望ましいが、これらに限定されるものではない。これらは単独あるいは混合物として使用され、任意の量を用いることができる。

【0020】次に酸化カップリングによるポリフェノール重合物について説明する。酸化カップリングによるポリフェノール重合物の製造方法は、特に限定されない。たとえば、ポリフェノール同士を、触媒の存在下で反応させることによりポリフェノール重合物を得ることができる。

【0021】ポリフェノールの酸化カップリングで使用される触媒は、フェノール類の酸化を起こすのに十分な酸化能を有するものであれば特に制限はないが、オキシダーゼまたはペルオキシダーゼが好ましい。具体例としては、ラッカーゼ、ペルオキシダーゼ、チロシナーゼ、フェノラーゼ、ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼが挙げられる。これらの酵素は種々の起源のものが使用でき、特に制限はないが、例えば植物由来、細菌由来、担子菌類由来の酸化酵素を挙げることができる。これらの中で、ラッカーゼは酸化能が高く、しかも酸化剤として空気中の酸素が利用できるために、好ましく使用することができる。ラッカーゼの例としては、漆の木から得られるラッカーゼ、Pyricularia、Pleurotus、Pycnoporus、Polystictus、Mycelophthora、Neurospora属の微生物ラッカーゼを挙げることができる。特にPycnoporus、Mycelophthora属のラッカーゼを好ましく使用できる。なお使用する酵素は、精製・未精製を問わない。酵素量はポリフェノール1gに対して0.001mg~10g、好ましくは0.005mg~5g、さらに好ましくは0.01mg~3gである。

【0022】ポリフェノールの酸化カップリングで使用される溶媒としては、ポリフェノールと触媒が共に溶解するものが好ましく、水または有機溶媒と水の混合溶媒が挙げられる。水は蒸留水や脱イオン水でもよいが、水の代わりに緩衝液を用いてもよい。緩衝液を用いる場合はpH2~12の範囲が望ましい。緩衝液の種類としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液等が望まし

いが、これらに限定されるものではない。

【0023】混合溶媒を用いる場合の有機溶媒は水と相溶する溶媒がより好ましい。水と相溶する有機溶媒として、メタノール、エタノール、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン、ニトロメタン、ニトロベンゼン、ピリジン、1, 4-ジオキサン、アセトン、メチルエチルケトン等が挙げられる。これらは単独あるいは混合物として使用される。また、有機溶媒-水の混合比はポリフェノールと酵素触媒が共に溶解する任意の量を用いることができる。好ましくは0.01:99.99~90:10、特に好ましくは1:99~80:20の範囲が望ましい。

【0024】反応温度は、酵素触媒が不活性化しない温度が望ましい。好ましくは-20~100℃の範囲であり、より好ましくは0~60℃の範囲である。反応温度が高い場合は、一般に酵素は失活するが、混合溶媒系によっては酵素を安定化するので、その場合は高い反応温度も採用可能となる。

【0025】上記重合反応によって得られるポリフェノール重合物の数平均分子量はアルデヒドとの重縮合、酸化カップリングによるものであっても500から1,000,000の範囲とすることが可能である。

【0026】本発明において得られるポリフェノール重合物は、抗ガン活性の付与、過酸化脂質生成の抑制、DNAポリメラーゼ失活の防止等の抗酸化作用を有しており、各種用途の抗酸化剤に幅広く使用できる。

【0027】

【実施例】以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0028】実施例1

(ポリマー合成-1) 50ミリリットルナスフラスコに、カテキンを1.5グラム取り、15ミリリットルの

メタノールと15ミリリットルのリン酸緩衝液を加えて溶液を調製した。この溶液に5ミリグラムの西洋わさびペルオキシダーゼを加え室温で攪拌しながら、5%過酸化水素水3.4ミリリットルを1.7ミリリットル/時間の速度で滴下した。反応開始から24時間後、不溶性重合物を遠心分離により除去した。上澄み液の溶媒を減圧下留去した後、凍結乾燥によりポリマーを単離し、1.35グラムのポリマーを得た(試料1)。得られたポリマーの数平均分子量は4100、分子量分布6.6であった。カテキンの重合物であることは、UV、IR測定により確認した。

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400 (br, O-Hの伸縮振動), 1620, 1580 (s, 芳香族炭素の骨格振動), 1250, 1140, 1110, 1070 (m, フェノール、エーテルのC-O伸縮振動)

UV ( $\lambda_{\text{max}}$  (pH10.7水溶液)) 410nm (芳香族由来の  $n \rightarrow \pi^*$  遷移)

【0029】(スーパーオキシド消去能(SOD様活性)の検討) キサンチン/キサンチンノキシダーゼ系で発生させたスーパーオキシドをハイブリッド抗酸化剤により消去させ、その効果を評価した。評価系中に酸化型のチトクロームCを加えると、発生したスーパーオキシドにより酸化型のチトクロームCが還元され、その際に550nmにおける吸光度が上昇する。この原理を利用して、SOD様活性を測定した。具体的には石英セルに3ミリリットルのリン酸緩衝溶液、キサンチン(1ミリグラム/ml)100マイクロリットル、チトクロームC(3.9ミリグラム/ml)100マイクロリットル、0.5マイクログラム/1ミリリットルのポリフェノール重合体溶液100マイクロリットルを加え、均一溶液を調製した。この溶液にキサンチンノキシダーゼ(0.6ミリグラム/ml)100マイクロリットルを加えた後、550nmの吸光度変化を経時的に測定した。抗酸化性(%)は以下の式より求めた。

【外1】

$$\text{抗酸化性}(\%) = \left[ 1 - \frac{\text{試料の吸光度変化}}{\text{試料未添加の際の吸光度変化}} \right] \times 100$$

上記式より導かれた試料1の抗酸化性の結果について図1に示す。

【0030】実施例2

(ポリマー合成-2) 50ミリリットルナスフラスコに、カテキンを0.75グラム取り、15ミリリットルのメタノールと15ミリリットルのリン酸緩衝液を加えて溶液を調製した。この溶液に0.7ミリリットルのラッカーゼを加え室温で攪拌反応を開始した。反応開始から24時間後、沈殿物を遠心分離によって回収し、0.53グラムのポリマーを得た(試料2)。ポリマーの数平均分子量は3000、分子量分布は5.0であった。抗酸化性を実施例1と同様の方法を用いて調べた。

【0031】実施例3

(ポリマー合成-3) 50ミリリットルナスフラスコに、ルチンを0.2グラム取り、10ミリリットルのメタノールと10ミリリットルの酢酸緩衝液(pH5)を加えて溶液を調製した。0.02ミリリットルのラッカーゼを加え室温で攪拌反応を開始した。反応開始から24時間後、カットオフ分子量1000の透析膜を用い、未反応のモノマーや塩類を除去し、凍結乾燥によりポリマーを単離し、0.15グラムのポリマーを得た(試料3)。得られたポリマーの数平均分子量は7100、分子量分布1.5であった。ルチンの重合物であることは、UV、IR測定により確認した。

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400 (br, O-Hの伸縮振動), 1650 (s, カルボニル基の伸縮振動), 1610, 1500 (s, 芳香族炭素の骨格振動), 1200, 1070 (m, フェノール、エーテル、糖水酸基のC-O伸縮振動)  
 UV ( $\lambda_{\text{max}}$  (蒸留水)) 250, 350nm (芳香族由来の $\pi-\pi^*$ 遷移)

抗酸化性を実施例1と同様の方法を用いて調べた。

#### 【0032】実施例4

(ポリマー合成-4) 200ミリリットルナスフラスコに、1.45グラムのカテキンを取り、4.1ミリリットルの酢酸、12ミリリットルのエタノール、90ミリリットル蒸留水に溶解させた。カテキンの溶解後、14.5ミリリットルの90%アセトアルデヒド溶液を加え、室温で23時間攪拌した。反応終了後のポリマーの単離・精製は実施例1と同様に行い、1.56グラムのポリマーを得た(試料4)。ポリマーの数平均分子量は9500、分子量分布は1.6であった。ポリマーの構造解析をNMRを用いて行ったところ、カテキンの6位と8位で結合したカテキン-アセトアルデヒド重合体であることを確認した。

$^1\text{H}$  NMR(DMSO- $d_6$ , ppm) 1.1-1.9 (br,  $\text{CH}_3$ ), 2.3-3.2 (br, H-4), 2.8-3.2 (br, H-3), 4.0-4.6 (br, H-2, CH), 6.5-7.2 (mH-2', H-5', H-6')

$^{13}\text{C}$  NMR(DMSO- $d_6$ , ppm) 18-22 (m,  $\text{CH}_3$ ), 26-31 (m, C-4), 41 (s, CH), 69-71 (m, C-3), 85-87 (m, C-2), 105-107 (m, C-4a), 111-113, 117-118 (m, C-6, C-8), 118-119 (m, C-2', C-5'), 121-123 (m, C-6'), 131-134 (m, C-1'), 147-148 (m, C-3', C-4'), 152-157 (m, C-5, C-7, C-8a)

#### 【0033】実施例5

(ポリマー合成-5) アセトアルデヒドを0.28ミリリットル用い、反応温度を35℃、反応時間を48時間とした以外はポリマー合成-3と同様の実験を行った。得られた試料は1.48グラムであった(試料5)。ポリマーの数平均分子量は1900、分子量分布は1.7であった。抗酸化性を実施例1と同様の方法を用いて調べた。

#### 【0034】実施例6

(ポリマー合成-6) エタノールを90ミリリットル、蒸留水を12ミリリットル、アセトアルデヒドを0.28ミリリットル用いた以外はポリマー合成-3と同様の実験を行った。得られた試料は1.56グラムであった(試料6)。ポリマーの数平均分子量は840、分子量分布は1.9であった。

(ポリマー合成-7) 200ミリリットルナスフラスコに、茶抽出物(東京テクノフード製、ポリフェノン70

S)を1.45グラム取り、4.1ミリリットルの酢酸、12ミリリットルのエタノール、90ミリリットルの蒸留水からなる混合溶媒を加えて反応溶液を調製した。この溶液に14.5ミリリットルのアセトアルデヒドを加え35℃で48時間攪拌した。反応終了後、沈殿物を遠心分離によって回収し、0.34グラムのポリマーを得た(試料7)。ポリマーの数平均分子量は28000、分子量分布は3.5であった。抗酸化性を実施例1と同様の方法を用いて調べた。

#### 【0035】(試験例2)(血管内皮細胞の生存率の検討)

試料を添加する15時間前に、血管内皮細胞を96ウエルプレートに60000個播種した。試料添加直前に、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (DMEM)で細胞を洗浄した後、100 $\mu\text{M}$ (上述の実施例に記載されているように作製した試料3とルチンは400 $\mu\text{M}$ )の試料を細胞に投じ、37℃で1時間インキュベートした。その後、フリーラジカル開始剤である2, 2-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩(AAPH)を20mMになるように添加し、引き続き37℃で24時間インキュベートした。インキュベート後、ウエル中の溶液を取り除き、アラマブルーを10%含むRPMI溶液を200マイクロリットル加え、37℃で4時間インキュベートした。その後、マルチプレートリーダーで570ナノメートルと600ナノメートルの吸光度を測定し、血管内皮細胞の生存率を決定した。試験結果を図2に示す。コントロールは、上述のAAPHのみを適用して、殺菌の様子を調べたものである。この結果、いずれのポリフェノール重合体も抗酸化性を示し、カテキン重合体(上述の実施例に記載されているように作製した試料1と4)はカテキンと同等あるいはそれ以上の細胞生存率(抗酸化性)を示し、ルチン重合体(上述の実施例に記載されているように作製した試料3)はルチンに見られない抗酸化性を示した。

#### 【0036】

【発明の効果】本発明によると、ポリフェノールをアルデヒド類との重縮合または酸化重合することにより、抗酸化作用を有するポリマーを提供することができる。これらのポリフェノール重合物は、抗ガン活性の付与、過酸化脂質生成の抑制、DNAポリメラーゼ失活の防止等の抗酸化作用に基づく用途の抗酸化剤に幅広く使用できる。

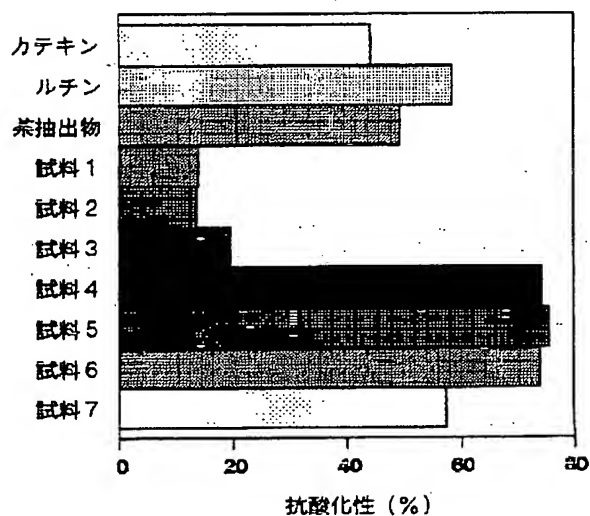
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 各試料の抗酸化性を示す。

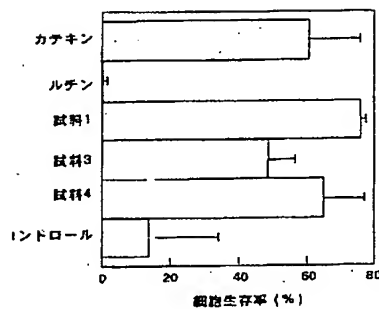
【図2】 血管内皮細胞の生存率を調べることによる各試料の抗酸化性を示す。



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

(参考)

C 0 8 G 8/20

C 0 8 G 8/20

Z

65/44

65/44

C 0 9 K 15/34

C 0 9 K 15/34

(72)発明者 小林 四郎

京都府京都市山科区御陵黒岩23-2-311

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 FA02 MA01 MA04

NA14 ZB21 ZB26 ZC02 ZC33

ZC37

4H025 AA84 AC01

4J005 AA26 BA00 BB01

4J033 CA02 CA05 CA13 CA14 CB02

HA02